

Minuman teh dalam kemasan



© BSN 2011

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang menyalin atau menggandakan sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun dan dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Manggala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup	1
2 Acuan normatif.....	1
3 Istilah dan definisi	1
4 Komposisi	1
5 Syarat mutu.....	1
6 Pengambilan contoh	2
7 Cara uji	2
8 Syarat lulus uji.....	3
9 Higiene.....	3
10 Pengemasan.....	3
11 Syarat penandaan	3
Lampiran A (normatif) Cara uji minuman teh dalam kemasan	4
Bibliografi.....	32
Tabel 1 - Syarat mutu minuman teh dalam kemasan	1
Tabel A.1 - APM/100 mL contoh bila menggunakan 3 x 5 tabung untuk setiap pengenceran 10 mL/100 mL; 1,0 mL/100 mL; dan 0,1 mL/ 100 mL.....	21
Tabel A.2 - Reaksi biokimia <i>Escherichia coli</i> pada uji IMVIC	23
Tabel A.3 - Reaksi biokimia dan serologi untuk <i>Salmonella</i> sp.	30
Tabel A.4 - Reaksi biokimia dan serologi untuk non <i>Salmonella</i> sp.	31

Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) *Minuman teh dalam kemasan* ini merupakan revisi SNI 01 – 3143 – 1992 Minuman teh dalam kemasan. Standar ini direvisi dan dirumuskan dengan tujuan sebagai berikut :

- Menyesuaikan standar dengan perkembangan teknologi terutama dalam metode uji dan persyaratan mutu;
- Menyesuaikan standar dengan peraturan-peraturan baru yang berlaku.
- Melindungi kesehatan konsumen;
- Menjamin perdagangan pangan yang jujur dan bertanggung jawab;
- Mendukung perkembangan dan diversifikasi produk industri minuman teh dalam kemasan.

Standar ini dirumuskan dengan memperhatikan hal-hal yang tertera dalam :

1. Undang-Undang Republik Indonesia No.5 Tahun 1984 tentang Perindustrian.
2. Undang-Undang Republik Indonesia No.36 Tahun 2009 tentang Kesehatan.
3. Undang-Undang Republik Indonesia No.7 Tahun 1996 tentang Pangan.
4. Undang-Undang Republik Indonesia No. 8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen.
5. Peraturan Pemerintah No.69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.
6. Peraturan Pemerintah No.28 Tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu, dan Gizi Pangan.
7. Keputusan Menteri Kesehatan /SK RI No. 907/MENKES/SK/VII/2002 Tanggal 29 Juli 2002 Tentang Syarat-Syarat dan Pengawasan Kualitas Air Minum.
8. Peraturan Menteri Kesehatan No. 722/Menkes/Per/IX/1988 tentang Bahan Tambahan Pangan atau revisinya.
9. Peraturan Menteri Perindustrian No. 24/M-IND/2/2010 tentang Pencantuman Logo Tara Pangan dan Kode Daur Ulang pada Kemasan Pangan dari Plastik.
10. Peraturan Menteri Perindustrian No. 75/M-IND/7/2010 tentang Pedoman Cara Produksi Pangan Olahan Yang Baik (Good Manufacturing Practices).
11. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.06.1.52.4011 Tahun 2009 tentang Penetapan Batas Maksimum Cemaran Mikroba dan Cemaran Kimia dalam Makanan.

Standar ini dirumuskan oleh Panitia Teknis 67-04 Makanan dan Minuman, yang telah dibahas melalui rapat teknis, dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 10 November 2009 di Jakarta. Hadir dalam rapat tersebut wakil dari konsumen, produsen, lembaga pengujian, lembaga ilmu pengetahuan dan teknologi, dan instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 27 April 2011 sampai dengan tanggal 26 Juni 2011 dengan hasil akhir RASNI.

Minuman teh dalam kemasan

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan istilah dan definisi, syarat mutu, pengambilan contoh, dan cara uji minuman teh dalam kemasan. Standar ini tidak berlaku untuk minuman teh dalam kemasan yang berkarbonasi.

2 Acuan normatif

SNI 0429, *Petunjuk pengambilan contoh cairan dan semi padat*.

3 Istilah dan definisi

3.1

minuman teh dalam kemasan

produk minuman yang diperoleh dari seduhan teh (*Camellia sinensis* L.) atau ekstrak teh atau teh instan atau campurannya dalam air minum dengan atau tanpa penambahan gula, bahan pangan lain, dan bahan tambahan pangan yang diizinkan, dan dikemas secara kedap

4 Komposisi

4.1 Bahan baku

teh atau ekstrak teh atau teh instan dan air minum

4.2 Bahan pangan lain

bahan pangan yang diizinkan untuk minuman teh dalam kemasan sesuai dengan ketentuan yang berlaku

4.3 Bahan tambahan pangan

bahan tambahan pangan yang diizinkan untuk minuman teh dalam kemasan sesuai dengan ketentuan yang berlaku

5 Syarat mutu

Syarat mutu minuman teh dalam kemasan sesuai Tabel 1 di bawah ini.

Tabel 1 - Syarat mutu minuman teh dalam kemasan

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
1	Keadaan		
1.1	Bau	-	khas teh
1.2	Rasa	-	khas teh
2	Kadar polifenol	mg/kg	min. 400

Tabel 1 (lanjutan)

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
3	Cemaran logam		
3.1	Kadmium (Cd)	mg/kg	maks. 0,2
3.2	Timbal (Pb)	mg/kg	maks. 0,2
3.3	Timah (Sn)	mg/kg	maks. 40,0 maks. 150,0*
3.4	Merkuri (Hg)	mg/kg	maks. 0,03
4	Cemaran arsen (As)	mg/kg	maks. 0,1
5	Cemaran mikroba:		
5.1	Angka lempeng total (35 °C, 48 jam)	koloni/mL	maks. 1×10^2
5.2	Bakteri <i>Coliform</i>	APM/100 mL	< 1,8
5.3	<i>Escherichia coli</i>	-	negatif / 100 mL
5.4	<i>Salmonella</i> sp.	-	negatif / 100 mL
Keterangan: * untuk produk yang dikemas dalam kaleng			

6 Pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh sesuai dengan SNI 0429, *Petunjuk pengambilan contoh cairan dan semi padat*.

7 Cara uji

Cara uji untuk minuman teh dalam kemasan seperti di bawah ini:

- Persiapan contoh sesuai Lampiran A.1
- Cara uji keadaan sesuai Lampiran A.2
 - Cara uji bau sesuai Lampiran A.2.1
 - Cara uji rasa sesuai Lampiran A.2.2
- Cara uji kadar polifenol sesuai Lampiran A.3
- Cara uji cemaran logam sesuai Lampiran A.4
 - Cara uji kadmium (Cd) dan timbal (Pb) sesuai Lampiran A.4.1
 - Cara uji timah (Sn) sesuai Lampiran A.4.2
 - Cara uji merkuri (Hg) sesuai Lampiran A.4.3
- Cara uji cemaran arsen (As) sesuai Lampiran A.5
- Cara uji cemaran mikroba sesuai Lampiran A.6
 - Persiapan dan homogenisasi contoh sesuai Lampiran A.6.1
 - Cara uji angka lempeng total (35 °C, 48 jam) sesuai Lampiran A.6.2
 - Cara uji bakteri *Coliform* dan *Escherichia coli* sesuai Lampiran A.6.3
 - Cara uji *Salmonella* sp. sesuai Lampiran A.6.4

8 Syarat lulus uji

Produk dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu sesuai pasal 5.

9 Higiene

Cara memproduksi produk yang higienis termasuk cara penyiapan dan penanganannya sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang Pedoman Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik.

10 Pengemasan

Produk dikemas dalam wadah yang tertutup kedap, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

11 Syarat penandaan

Syarat penandaan sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang label dan iklan pangan.



Lampiran A
(normatif)
Cara uji minuman teh dalam kemasan

A.1 Persiapan contoh

Persiapan contoh terdiri atas persiapan contoh untuk uji mikrobiologi, uji organoleptik, dan uji kimia. Pengambilan contoh untuk uji mikrobiologi dilakukan pertama, kemudian dilanjutkan dengan pengambilan contoh untuk uji organoleptik dan uji kimia.

A.1.1 Persiapan contoh untuk uji mikrobiologi

Buka kemasan contoh minuman teh dalam kemasan dan ambil contoh secara aseptik sebanyak 400 mL, kemudian tempatkan dalam botol contoh steril.

A.1.2 Persiapan contoh untuk uji organoleptik

Buka kemasan contoh minuman teh dalam kemasan dan ambil contoh secukupnya kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

A.1.3 Persiapan contoh untuk uji kimia

Buka kemasan contoh minuman teh dalam kemasan dan ambil contoh sebanyak 400 mL, kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

A.2 Keadaan

A.2.1 Bau

A.2.1.1 Prinsip

Pengamatan contoh uji dengan indera penciuman yang dilakukan oleh panelis yang terlatih dan kompeten untuk pengujian organoleptik.

A.2.1.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) cium contoh uji untuk mengetahui baunya; dan
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.1.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika tidak tercium bau asing, maka hasil dinyatakan "khas teh"; dan
- b) jika tercium bau asing, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

A.2.2 Rasa

A.2.2.1 Prinsip

Pengamatan contoh uji dengan indera indera pengecap (lidah) yang dilakukan oleh panelis yang terlatih dan kompeten untuk pengujian organoleptik.

A.2.2.2 Cara kerja

- Ambil contoh uji secukupnya dan rasakan dengan indera pengecap (lidah); dan
- lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.2.3 Cara menyatakan hasil

- Jika tidak terasa rasa asing, maka hasil dinyatakan “khas teh”; dan
- jika terasa rasa asing, maka hasil dinyatakan “tidak normal”.

A.3 Kadar polifenol

A.3.1 Prinsip

Oksidasi atau reduksi komponen polifenol menggunakan pereaksi *Folin Ciocalteu* dalam media basa, menghasilkan kompleks biru molibdenum-tungsten, yang dibaca pada panjang gelombang 740 nm.

A.3.2 Peralatan

- Spektrofotometer UV-Vis terkalibrasi;
- Penangas ultrasonik;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Magnetic stirrer*;
- Labu ukur 250 mL, 100 mL, 50 mL, dan 25 mL;
- Pipet volumetrik 5 mL, 4 mL, dan 1 mL terkalibrasi;
- Tabung reaksi;
- Gelas piala 500 mL dan 100 mL;
- Vortex mixer*; dan
- Botol berwarna coklat.

A.3.3 Pereaksi

- Standar asam galat;
- Pereaksi *Folin Ciocalteu* 10 %;
pipet larutan *Folin Ciocalteu* pekat sebanyak 10 mL dalam labu ukur 100 ml, tepatkan dengan air suling sampai tanda garis, kemudian larutkan dan homogenkan. Simpan dalam wadah (botol coklat) agar tidak terkena sinar matahari.
- Pereaksi natrium karbonat 7,5 %; dan
timbang natrium karbonat sebanyak 7,5 g masukkan dalam gelas piala 100 mL, tepatkan dengan air suling sampai tanda garis, larutkan dan homogenkan menggunakan *magnetic stirrer*.
- Air suling.

A.3.3 Cara kerja

A.3.3.1 Pembuatan deret standar

- Buat standar induk 250 µg/mL, dengan cara menimbang 0,0625 g standar asam galat, kemudian masukkan ke dalam labu ukur 250 mL;
- tambahkan ± 50 mL air suling, masukkan dalam penangas ultrasonik selama 10 menit (sampai larut);
- tambahkan air hingga tanda tera, homogenkan;

- d) buat deret standar 10,25, 50, 75, dan 100 mg/kg, masing-masing dimasukkan dalam labu ukur 25 mL;
- e) dari masing-masing larutan standar tersebut, diambil sebanyak 1 mL dengan menggunakan pipet volumetrik;
- f) tambahkan pereaksi *Folin Ciocalteu* 10 % sebanyak 5 mL, diamkan selama 3 - 8 menit;
- g) tambahkan pereaksi natrium karbonat 7,5 % sebanyak 4 mL;
- h) aduk menggunakan *vortex mixer*, sampai homogen;
- i) diamkan selama 2 jam (lindungi dari cahaya);
- j) ukur absorban masing-masing standar pada panjang gelombang 740 nm; dan
- k) buat grafik linearitas standar, konsentrasi (mg/kg) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- l) secara statistik diperoleh persamaan $Y = a + bX$,

A.3.3.2 Penentuan kadar polifenol

- a) Timbang contoh sebanyak 10 g (W), masukkan ke dalam labu ukur 100 mL;
- b) tambahkan air suling sebanyak ± 25 mL, sonikasi selama 10 menit (sampai larut);
- c) tambahkan air suling hingga tanda tera, homogenkan;
- d) pipet larutan tersebut menggunakan pipet volumetrik sebanyak 1 mL dan masukkan ke dalam tabung reaksi 15 mL (lindungi dari cahaya);
- e) tambahkan pereaksi *Folin Ciocalteu* 10 % sebanyak 5 mL, diamkan selama 3 - 8 menit;
- f) tambahkan pereaksi natrium karbonat 7,5 % sebanyak 4 mL;
- g) aduk menggunakan *vortex mixer*, sampai homogen;
- h) diamkan selama 2 jam (lindungi dari cahaya);
- i) ukur absorban pada panjang gelombang 740 nm; dan
- j) hitung kadar polifenol dalam contoh berdasarkan kurva kalibrasi.

A.3.4 Perhitungan

$$\text{Kadar polifenol (mg/kg)} = \frac{[\text{Absorban} - a]/b \times 100}{W}$$

Keterangan:

- W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
 a adalah intersep linearitas standar;
 b adalah kemiringan linearitas standar.

A.4 Cemaran logam

A.4.1 Kadmium (Cd) dan timbal (Pb)

A.4.1.1 Prinsip

Destruksi contoh dengan cara pengabuan kering pada suhu 450 °C yang dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Logam yang terlarut dihitung menggunakan alat Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) dengan panjang gelombang maksimal 228,8 nm untuk Cd dan 283,3 nm untuk Pb.

A.4.1.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Cd dan Pb) terkalibrasi (sebaiknya menggunakan SSA tungku grafit);
- b) Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- c) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;

- d) Pemanas listrik;
- e) Penangas air;
- f) Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi;
- g) Labu ukur 1 000 mL, 100 mL, dan 50 mL, terkalibrasi;
- h) Gelas ukur 10 mL terkalibrasi;
- i) Gelas piala 250 mL;
- j) Botol polipropilen;
- k) Cawan porselen/platina/kuarsa 50 mL sampai dengan 100 mL; dan
- l) Kertas saring tidak berabu dengan spesifikasi *particle retention liquid* 20 μm sampai dengan 25 μm .

A.4.1.3 Pereaksi

- a) Asam nitrat, HNO_3 pekat;
- b) Asam klorida, HCl pekat;
- c) Larutan asam nitrat, HNO_3 0,1 N;
encerkan 7 mL HNO_3 pekat dengan air suling dalam labu ukur 1 000 mL sampai tanda garis.
- d) Larutan asam klorida, HCl 6 N;
encerkan 500 mL HCl pekat dengan air suling dalam labu ukur 1 000 mL sampai tanda garis.
- e) Larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Cd;
larutkan 1,000 g Cd dengan 7 mL HNO_3 pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Cd 1 000 $\mu\text{g/mL}$ siap pakai.
- f) Larutan baku 200 $\mu\text{g/mL}$ Cd;
pipet 10 mL larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Cd ke dalam labu ukur 50 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 200 $\mu\text{g/mL}$ Cd.
- g) Larutan baku 20 $\mu\text{g/mL}$ Cd;
pipet 10 mL larutan baku 200 $\mu\text{g/mL}$ Cd ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 20 $\mu\text{g/mL}$ Cd.
- h) Larutan baku kerja Cd;
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL, 0,5 mL, 1 mL; 2 mL; 4 mL; 7 mL dan 9 mL larutan baku 20 $\mu\text{g/mL}$ kemudian tambahkan 5 mL larutan HNO_3 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g/mL}$; 0,1 $\mu\text{g/mL}$; 0,2 $\mu\text{g/mL}$; 0,4 $\mu\text{g/mL}$; 0,8 $\mu\text{g/mL}$; 1,4 $\mu\text{g/mL}$ dan 1,8 $\mu\text{g/mL}$ Cd.
- i) Larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Pb;
larutkan 1,000 g Pb dengan 7 mL HNO_3 pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Pb 1 000 $\mu\text{g/mL}$ siap pakai.
- j) Larutan baku 50 $\mu\text{g/mL}$ Pb; dan
pipet 5,0 mL larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Pb ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Pb 50 $\mu\text{g/mL}$.
- k) Larutan baku kerja Pb;
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL, 0,2 mL; 0,5 mL; 1 mL; 2 mL; 3 mL dan 4 mL larutan baku 50 $\mu\text{g/mL}$ kemudian tambahkan 5 mL larutan HNO_3 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g/mL}$; 0,1 $\mu\text{g/mL}$; 0,25 $\mu\text{g/mL}$; 0,5 $\mu\text{g/mL}$; 1,0 $\mu\text{g/mL}$; 1,5 $\mu\text{g/mL}$ dan 2,0 $\mu\text{g/mL}$ Pb.

A.4.1.4 Cara kerja

- Timbang 10 g sampai dengan 20 g contoh dengan teliti dalam cawan porselen/ platina/ kuarsa (m);
- tempatkan cawan berisi contoh uji di atas pemanas listrik dan panaskan secara bertahap sampai contoh uji tidak berasap lagi;
- lanjutkan pengabuan dalam tanur pada suhu $(450 \pm 5) ^\circ\text{C}$ sampai abu berwarna putih, bebas dari karbon;
- apabila abu belum bebas dari karbon yang ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan dengan beberapa tetes air dan tambahkan tetes demi tetes HNO_3 pekat kira-kira 0,5 mL sampai dengan 3 mL;
- keringkan cawan di atas pemanas listrik dan masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu $(450 \pm 5) ^\circ\text{C}$ kemudian lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan HNO_3 pekat dapat diulangi apabila abu masih berwarna keabu-abuan;
- larutkan abu berwarna putih dalam 5 mL HCl 6 N, sambil dipanaskan di atas pemanas listrik atau penangas air sampai kering, kemudian larutkan dengan HNO_3 0,1 N dan masukkan ke dalam labu ukur 50 mL kemudian tepatkan hingga tanda garis dengan air suling (V), jika perlu, saring larutan menggunakan kertas saring, ke dalam botol polipropilen;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimal sekitar 228,8 nm untuk Cd dan 283,3 nm untuk Pb;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C); dan
- hitung kandungan logam dalam contoh.

A.4.1.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan logam, (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/mL}$);
 V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL); dan
 m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

A.4.1.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan logam. Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka uji, harus diulang kembali.

A.4.2 Timah (Sn)**A.4.2.1 Prinsip**

Contoh didestruksi dengan HNO_3 dan HCl kemudian tambahkan KCl untuk mengurangi gangguan. Sn dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang maksimal 235,5 nm dengan nyala oksidasi $\text{N}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2$.

A.4.2.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Sn) terkalibrasi;

- b) Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- c) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- d) Penangas air;
- e) Pemanas listrik;
- f) Labu ukur 1 000 mL, 100 mL, dan 50 mL, terkalibrasi;
- g) Pipet ukur 10 mL, 5 mL, berskala 0,1 mL, terkalibrasi;
- h) Erlenmeyer 250 mL;
- i) Gelas ukur 50 mL terkalibrasi; dan
- j) Gelas piala 250 mL.

A.4.2.3 Perekasi

- a) Larutan kalium klorida, 10 mg/mL K;
larutkan 1,91 g KCl dengan air menjadi 100 mL.
- b) Asam nitrat, HNO₃ pekat;
- c) Asam klorida, HCl pekat;
- d) Larutan baku 1 000 µg/mL Sn; dan
larutkan 1,000 g Sn dengan 200 mL HCl pekat dalam labu ukur 1000 mL, tambahkan 200 mL air suling, dinginkan pada suhu ruang dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- e) Larutan baku kerja Sn.
pipet 10 mL HCl pekat dan 1,0 mL larutan KCl ke dalam masing-masing labu ukur 100 mL. Tambahkan masing-masing 0 mL; 0,5 mL; 1,0 mL; 1,5 mL; 2,0 mL dan 2,5 mL larutan baku 1000 µg/mL Sn dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/mL; 5 µg/mL; 10 µg/mL; 15 µg/mL; 20 µg/mL dan 25 µg/mL Sn.

A.4.2.4 Cara kerja

- a) Timbang 10 g sampai dengan 20 g (m) dengan teliti ke dalam Erlenmeyer 250 mL, tambahkan 30 mL HNO₃ pekat dan biarkan 15 menit;
- b) panaskan perlahan selama 15 menit di dalam lemari asam, hindari terjadinya percikan yang berlebihan;
- c) lanjutkan pemanasan sehingga sisa volume 3 mL sampai dengan 6 mL atau sampai contoh mulai kering pada bagian bawahnya, hindari terbentuknya arang;
- d) angkat Erlenmeyer dari pemanas listrik, tambahkan 25 mL HCl pekat, dan panaskan selama 15 menit sampai letupan dari uap Cl₂ berhenti;
- e) tingkatkan pemanasan dan didihkan sehingga sisa volume 10 mL sampai dengan 15 mL;
- f) tambahkan 40 mL air suling, aduk, dan tuangkan ke dalam labu ukur 100 mL, bilas Erlenmeyer tersebut dengan 10 mL air suling (V);
- g) tambahkan 1,0 mL KCl, dinginkan pada suhu ruang, tepatkan dengan air suling sampai tanda garis dan saring;
- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimal 235,5 nm dengan nyala oksidasi N₂O-C₂H₂;
- j) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- k) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- l) lakukan pengerjaan duplo; dan
- m) hitung kandungan logam dalam contoh.

A.4.2.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan logam (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

Keterangan:

C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/mL}$)

V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL); dan

m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

A.4.2.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan logam. Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka uji harus diulang kembali.

A.4.3 Merkuri (Hg)

A.4.3.1 Prinsip

Reaksi antara senyawa merkuri dengan NaBH_4 atau SnCl_2 dalam keadaan asam akan membentuk gas atomik Hg. Jumlah Hg yang terbentuk sebanding dengan absorbansi Hg yang dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) tanpa nyala pada panjang gelombang maksimal 253,7 nm.

A.4.3.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) yang dilengkapi lampu katoda Hg dan generator uap hidrida (HVG) terkalibrasi;
- Microwave digester*;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;
- Pendingin terbuat dari borosilikat, diameter 12 mm sampai dengan 18 mm, tinggi 400 mm diisi dengan cincin *Raschig* setinggi 100 mm, dan dilapisi dengan batu didih berdiameter 4 mm di atas cincin setinggi 20 mm;
- Tabung destruksi;
- Labu destruksi 250 mL berdasar bulat;
- Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- Gelas ukur 25 mL terkalibrasi;
- Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi; dan
- Gelas piala 500 mL.

A.4.3.3 Pereaksi

- Larutan asam sulfat, H_2SO_4 9 M;
- Larutan asam nitrat, HNO_3 7 M;
- Campuran HNO_3 : HClO_4 (1:1);
- Hidrogen peroksida, H_2O_2 pekat;
- Larutan natrium molibdat, $\text{NaMoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 %;
- Larutan pereduksi;
campurkan 50 mL H_2SO_4 dengan 300 mL air suling dalam gelas piala 500 mL dan dinginkan sampai suhu ruang kemudian tambahkan 15 g NaCl, 15 g hidroksilamin sulfat, dan 25 g SnCl_2 . Pindahkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Larutan natrium borohidrida, NaBH_4 ;
larutkan 3 g serbuk NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling dalam labu ukur 500 mL.
- Larutan pengencer;

masukkan 300 mL sampai dengan 500 mL air suling kedalam labu ukur 1 000 mL dan tambahkan 58 mL HNO_3 kemudian tambahkan 67 mL H_2SO_4 . Encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan kocok.

- i) Larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Hg;
larutkan 0,135 4 g HgCl_2 dengan kira-kira 25 mL air suling dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- j) Larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ Hg;
Pipet 1 mL larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Hg ke dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 1 $\mu\text{g/mL}$.
- k) Larutan baku kerja Hg; dan
Pipet masing-masing 0,25 mL; 0,5 mL; 1 mL; dan 2 mL larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,002 5 $\mu\text{g/mL}$; 0,005 $\mu\text{g/mL}$; 0,01 $\mu\text{g/mL}$; 0,02 $\mu\text{g/mL}$ Hg.
- l) Batu didih

A.4.3.4 Cara kerja

A.4.3.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g contoh (m) dengan teliti ke dalam labu destruksi dan tambahkan 25 mL H_2SO_4 9 M, 20 mL HNO_3 7 M, 1 mL larutan natrium molibdat 2 %, dan 5 butir sampai dengan 6 butir batu didih;
- b) hubungkan labu destruksi dengan pendingin dan panaskan di atas pemanas listrik selama 1 jam. Hentikan pemanasan dan biarkan selama 15 menit;
- c) tambahkan 20 mL campuran HNO_3 : HClO_4 (1:1) melalui pendingin;
- d) hentikan aliran air pada pendingin dan panaskan dengan panas tinggi hingga timbul uap putih. Lanjutkan pemanasan selama 10 menit dan dinginkan;
- e) tambahkan 10 mL air suling melalui pendingin dengan hati-hati sambil labu digoyang-goyangkan;
- f) didihkan lagi selama 10 menit;
- g) matikan pemanas listrik dan cuci pendingin dengan 15 mL air suling sebanyak 3 kali kemudian dinginkan sampai suhu ruang;
- h) pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 100 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- i) pipet 25 mL larutan di atas ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis;
- j) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- k) tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja Hg, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- l) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- m) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- n) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- o) lakukan pengerjaan duplo; dan
- p) hitung kandungan logam dalam contoh.

A.4.3.4.2 Destruksi menggunakan *microwave digester* atau destruksi sistem tertutup

- a) Timbang 1 g contoh (m) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 mL HNO_3 , 1 mL H_2O_2 kemudian tutup rapat;

- b) masukkan ke dalam *microwave digester* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- c) pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 50 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- d) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- e) tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- f) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- g) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- h) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- i) lakukan pengerjaan duplo; dan
- j) hitung kandungan logam dalam contoh;

A.4.3.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan logam (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V \times fp$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/mL}$)
 V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
 m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
 fp adalah faktor pengenceran.

A.4.3.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan logam. Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka uji harus diulang kembali.

A.5 Cemarkan arsen (As)

A.5.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan arsen. Larutan As^{5+} direduksi dengan KI menjadi As^{3+} dan direaksikan dengan NaBH_4 atau SnCl_2 sehingga terbentuk AsH_3 yang kemudian dibaca dengan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang maksimal 193,7 nm.

A.5.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) yang dilengkapi dengan lampu katoda As dan generator uap hidrida (HVG) terkalibrasi;
- b) Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1°C ;
- c) *Microwave digester* ;
- d) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- e) Pemanas listrik;
- f) *Burner* atau *bunsen*;
- g) Labu *Kjeldahl* 250 mL;
- h) Labu terbuat dari borosilikat berdasar bulat 50 mL;
- i) Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- j) Gelas ukur 25 mL terkalibrasi;
- k) Pipet volumetrik 25 mL terkalibrasi;
- l) Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi;
- m) Cawan porselen 50 mL; dan

- n) Gelas piala 200 mL.

A.5.3 Pereaksi

- a) Asam nitrat, HNO_3 pekat;
- b) Asam sulfat, H_2SO_4 pekat;
- c) Asam perklorat, HClO_4 pekat;
- d) Ammonium oksalat, $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ jenuh;
- e) Hidrogen peroksida, H_2O_2 pekat;
- f) Larutan natrium borohidrida, NaBH_4 4 %;
larutkan 3 g NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling sampai tanda garis dalam labu ukur 500 mL.
- g) Larutan asam klorida, HCl 8 M;
larutkan 66 mL HCl pekat kedalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- h) Larutan timah (II) klorida, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 %;
timbang 50 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ke dalam gelas piala 200 mL dan tambahkan 100 mL HCl pekat. Panaskan hingga larutan jernih dan dinginkan kemudian tuangkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- i) Larutan kalium iodida, KI 20 %;
timbang 20 g KI ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (larutan harus dibuat langsung sebelum digunakan).
- j) Larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 75 mg/mL;
larutkan 3,75 g MgO dengan 30 mL H_2O secara hati-hati, tambahkan 10 mL HNO_3 , dinginkan dan encerkan hingga 50 mL dengan air suling;
- k) Larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ As;
larutkan 1,320 3 g As_2O_3 kering dengan sedikit NaOH 20 % dan netralkan dengan HCl atau HNO_3 1:1 (1 bagian asam : 1 bagian air). Masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- l) Larutan baku 100 $\mu\text{g/mL}$ As;
pipet 10 mL larutan baku As 1 000 $\mu\text{g/mL}$ ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$ As.
- m) Larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ As; dan
pipet 1 mL larutan baku As 100 $\mu\text{g/mL}$ ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 1 $\mu\text{g/mL}$ As.
- n) Larutan baku kerja As;
pipet masing-masing 1,0 mL; 2,0 mL; 3,0 mL; 4,0 mL dan 5,0 mL larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ As ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,01 $\mu\text{g/mL}$; 0,02 $\mu\text{g/mL}$; 0,03 $\mu\text{g/mL}$; 0,04 $\mu\text{g/mL}$ dan 0,05 $\mu\text{g/mL}$ As.

A.5.4 Cara kerja

A.5.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g sampai dengan 10 g contoh (m) ke dalam labu *Kjeldahl* 250 mL, tambahkan 5 mL sampai dengan 10 mL HNO_3 pekat dan 4 mL sampai dengan 8 mL H_2SO_4 pekat dengan hati-hati;
- b) setelah reaksi selesai, panaskan dan tambahkan HNO_3 pekat sedikit demi sedikit sehingga contoh berwarna coklat atau kehitaman;
- c) tambahkan 2 mL HClO_4 70 % sedikit demi sedikit dan panaskan lagi sehingga larutan menjadi jernih atau berwarna kuning (jika terjadi pengarangan setelah penambahan HClO_4 , tambahkan lagi sedikit HNO_3 pekat);
- d) dinginkan, tambahkan 15 mL H_2O dan 5 mL $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ jenuh;

- e) panaskan sehingga timbul uap SO_3 di leher labu;
- f) dinginkan, pindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- g) pipet 25 mL larutan diatas dan tambahkan 2 mL HCl 8 M, 0,1 mL KI 20 % kemudian kocok dan biarkan minimal 2 menit;
- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) tambahkan larutan pereduksi (NaBH_4) ke dalam larutan baku kerja As, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- j) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 193,7 nm;
- k) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- l) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- m) lakukan pengerjaan duplo; dan
- n) hitung kandungan As dalam contoh.

A.5.4.2 Destruksi menggunakan *microwave digester* atau destruksi sistem tertutup

- a) Timbang 1 g contoh (m) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 mL HNO_3 , 1 mL H_2O_2 kemudian tutup rapat;
- b) masukkan ke dalam *microwave digester* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- c) setelah dingin, pindahkan larutan destruksi ke dalam labu ukur 25 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- d) pipet 10 mL larutan destruksi ke dalam labu terbuat dari borosilikat berdasar bulat 50 mL, tambahkan 1 mL larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$. Uapkan di atas pemanas listrik hingga kering dan arangkan. Abukan dalam tanur dengan suhu 450°C (± 1 jam);
- e) dinginkan, larutkan dengan 2,0 mL HCl 8 M, 0,1 mL KI 20 % dan biarkan minimal 2 menit. Tuangkan larutan tersebut ke dalam tabung contoh pada alat;
- f) siapkan NaBH_4 dan HCl dalam tempat yang sesuai dengan yang ditentukan oleh alat;
- g) tuangkan larutan baku kerja As 0,01 $\mu\text{g/mL}$; 0,02 $\mu\text{g/mL}$; 0,03 $\mu\text{g/mL}$; 0,04 $\mu\text{g/mL}$; 0,05 $\mu\text{g/mL}$ serta blanko ke dalam 6 tabung contoh lainnya. Nyalakan *burner* atau *bunsen* serta tombol pengatur aliran pereaksi dan aliran contoh;
- h) baca nilai absorbans tertinggi larutan baku kerja As dan contoh dengan blanko sebagai koreksi;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi As ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- k) lakukan pengerjaan duplo; dan
- l) hitung kandungan As dalam contoh.

A.5.4.3 Perhitungan

$$\text{Kandungan arsen (As) (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V \times fp$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi arsen (As) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/mL}$)
- V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
- m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
- fp adalah faktor pengenceran.

A.5.4.4 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan arsen (As). Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka uji harus diulang kembali.

A.6 Cemaran mikroba

A.6.1 Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji Angka Lempeng Total, Bakteri *Coliform* dan *Escherichia coli*

A.6.1.1 Prinsip

Pembebasan sel-sel bakteri yang mungkin terlindung oleh partikel minuman dan untuk menggiatkan kembali sel-sel bakteri yang mungkin viabilitasnya berkurang karena kondisi yang kurang menguntungkan dalam minuman. Persiapan dan homogenisasi contoh bertujuan agar bakteri terdistribusi dengan baik di dalam contoh minuman yang ditetapkan.

A.6.1.2 Peralatan

- Alat homogenisasi yang sesuai (blender) dengan kecepatan putaran 10 000 rpm sampai dengan 12 000 rpm;
- Otoklaf terkalibrasi;
- Penangas listrik;
- Neraca kapasitas 2 000 g terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- Gelas piala steril;
- Erlenmeyer steril;
- Botol pengencer steril;
- Pipet volumetrik steril 10,0 mL dan 1,0 mL terkalibrasi, dilengkapi dengan *bulb* dan *pipettor* ;
- Tabung reaksi; dan
- Sendok, gunting, dan spatula steril.

A.6.1.3 Larutan Pengencer

Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (BPB);

- KH_2PO_4 34 g
- Air suling 500 mL

Atur pH dengan NaOH sehingga mencapai pH 7,2, tepatkan volume sampai 1 000 mL dengan air suling. Sterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit, simpan pada refrigerator. Untuk membuat larutan pengencer 1,25 mL larutan stok diencerkan dengan air suling sampai volume 1 000 mL, larutan tersebut dimasukkan ke dalam botol pengencer sebanyak 450 mL dan tabung reaksi sebanyak 9 mL, kemudian disterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit.

A.6.1.4 Homogenisasi contoh

- Timbang 50 g contoh secara aseptik ke dalam botol pengencer yang telah berisi 450 mL larutan pengencer steril sehingga diperoleh pengenceran 1:10; dan
- kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

A.6.2 Angka lempeng total (35 °C, 48 jam)

A.6.2.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama 48 jam pada suhu $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

A.6.2.2 Peralatan

- Inkubator $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$, terkalibrasi;
- Oven/alat sterilisasi kering terkalibrasi;
- Otoklaf terkalibrasi;
- Penangas air bersirkulasi $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- Alat penghitung koloni;
- Tally register*;
- Botol pengencer 160 ml terbuat dari gelas borosilikat, dengan sumbat karet atau tutup ulir plastik;
- Pipet ukur 1 mL steril terkalibrasi dengan skala 0,1 ml dilengkapi *bulb* dan *pipettor*; dan
- Cawan petri gelas/plastik steril (berukuran minimal 15 mm x 90 mm).

A.6.2.3 Pembenihan dan pengencer

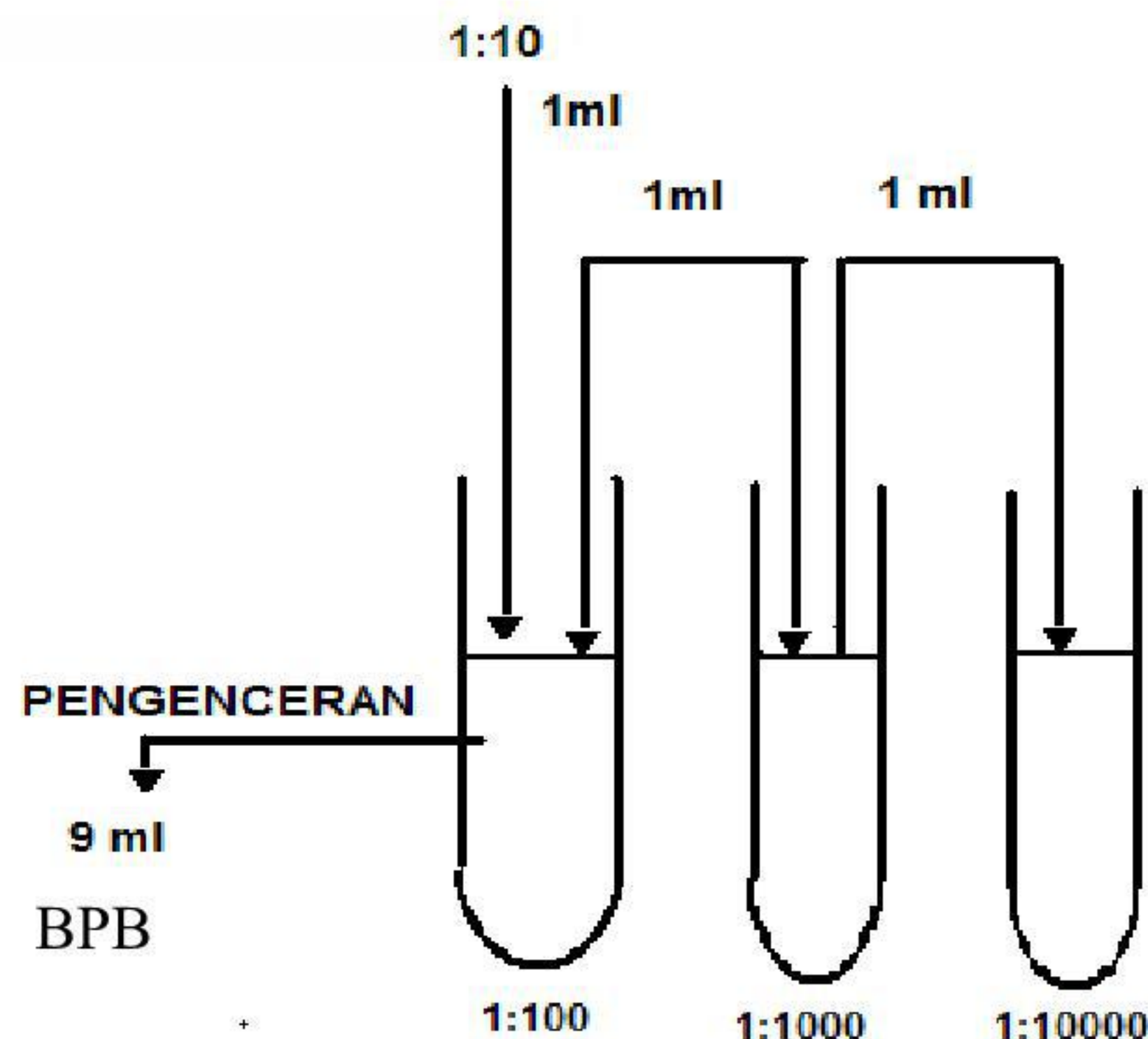
Plate count agar (PCA)

- | | |
|-----------------|----------|
| – Tryptone | 5 g |
| – Yeast extract | 2,5 g |
| – Glukosa | 1 g |
| – Agar | 15 g |
| – Air suling | 1 000 mL |

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1000 mL dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan ke dalam botol pengencer. Sterilkan dengan menggunakan otoklaf pada suhu $121 ^\circ\text{C}$ selama 15 menit.

A.6.2.4 Cara kerja

- Buat tingkat pengenceran sesuai kebutuhan seperti pada Gambar A.1 dengan menggunakan larutan pengencer *Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (BPB)*;
- pipet masing-masing 1 mL dari tingkat pengenceran (F) 10^{-1} sampai dengan 10^{-4} ke dalam cawan petri steril secara duplo;



Gambar A.1 - Tingkat pengenceran menggunakan larutan pengencer *Butterfield's Phosphate Buffered Dilution Water (BPB)*.

- c) tuangkan 12 mL sampai dengan 15 mL media PCA yang masih cair dengan suhu $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$ ke dalam masing-masing cawan petri;
- d) goyangkan cawan petri dengan hati-hati (putar dan goyang ke depan, ke belakang, ke kanan dan ke kiri) sehingga contoh dan pembenihan tercampur merata dan memadat;
- e) kerjakan pemeriksaan blanko dengan mencampur air pengencer untuk setiap contoh yang diperiksa;
- f) biarkan sampai campuran dalam cawan petri memadat;
- g) masukkan semua cawan petri dengan posisi terbalik ke dalam inkubator pada suhu $35 ^\circ\text{C}$ selama (48 ± 2) jam; dan
- h) catat pertumbuhan koloni (n) pada setiap cawan petri yang mengandung 25 koloni sampai dengan 250 koloni setelah 48 jam.

A.6.2.5 Perhitungan

Angka lempeng total (koloni/mL) = $n \times F$

Keterangan:

- n adalah rata - rata koloni dari dua cawan petri dari satu pengenceran, dinyatakan dalam koloni per mililiter (koloni/mL);
- F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai.

A.6.2.5 Pernyataan hasil

A.6.2.5.1 Cara menghitung

- a) Pilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni setiap cawan petri. Hitung semua koloni dalam cawan petri menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per mililiter;
- b) jika salah satu dari dua cawan petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 koloni atau lebih besar dari 250 koloni, hitung jumlah koloni yang terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per mililiter;

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
120	25
105	20

$$ALT = \frac{120 + 105 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 1) \times 10^{-2}]} = 124,9375$$

- c) jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran koloni per mililiter dengan rumus :

$$ALT = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times d]}$$

Keterangan:

C adalah jumlah koloni dari tiap-tiap petri;

n_1 adalah jumlah petri dari pengenceran pertama yang dihitung;

n_2 adalah jumlah petri dari pengenceran kedua; dan

d adalah pengenceran pertama yang dihitung;

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
131	30
143	25

$$ALT = \frac{131 + 143 + 30 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2) \times 10^{-2}]} = 164,3357$$

- d) jika jumlah koloni dari masing-masing petri lebih dari 25 koloni nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan;
- jika jumlah koloni per cm^2 kurang dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya sebagai jumlah perkiraan : jumlah bakteri dikalikan faktor pengenceran.

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}	Jumlah bakteri perkiraan
~	640	$1000 \times 640 = 640.000 (6,4 \times 10^5)$

- jika jumlah koloni per cm^2 lebih dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya: area x faktor pengenceran x 100 contoh rata-rata jumlah koloni 110 per cm^2

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}	area (cm^2)	jumlah bakteri perkiraan
~	7150	65	$> 65 \times 10^3 \times 100 = > 6500.000 (6,5 \times 10^6)$
~	6490	59	$> 59 \times 10^3 \times 100 = > 5900.000 (5,9 \times 10^6)$

- e) jika jumlah koloni dari masing-masing koloni yang tumbuh pada cawan petri kurang dari 25 koloni, maka nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari 25 koloni dikalikan pengenceran yang terendah; dan

- f) menghitung koloni yang merambat.

Perambatan pada koloni ada 3 macam, yaitu :

- perambatan berupa rantai yang tidak terpisah;
- perambatan yang terjadi diantara dasar cawan petri dan pembenihan; dan
- perambatan yang terjadi pada pinggir atau permukaan pembenihan.

Jika terjadi hanya satu perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap satu. Jika terbentuk lebih dari satu perambatan dan berasal dari sumber yang terpisah-pisah, maka tiap sumber dihitung sebagai satu koloni.

A.6.2.5.2 Cara membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka pertama dan kedua (dimulai dari kiri):

- a) Jika angka ketiga lebih besar dari 5, maka bulatkan ke atas;
contohnya : 528 dilaporkan sebagai 530 penulisannya $5,3 \times 10^2$
- b) jika angka ketiga kurang dari 5, maka bulatkan kebawah; dan
contohnya : 523 dilaporkan sebagai 520 penulisannya $5,2 \times 10^2$
- c) jika angka ketiga sama dengan 5, maka bulatkan sebagai berikut
 - bulatkan ke atas jika angka kedua merupakan angka ganjil; dan
contohnya : 575 dilaporkan sebagai 580 penulisannya $5,8 \times 10^2$
 - bulatkan ke bawah jika angka kedua merupakan angka genap
contohnya : 565 dilaporkan sebagai 560 penulisannya $5,6 \times 10^2$

A.6.3 Bakteri *Coliform* dan *Escherichia coli*

A.6.3.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri *Coliform* ditandai dengan terbentuknya gas pada tabung *Durham*, kemudian dirujuk pada Tabel APM (Angka Paling Mungkin), sedangkan pertumbuhan bakteri *E.coli* dilanjutkan dengan uji biokimia.

A.6.3.2 Peralatan

- a) Inkubator (35 ± 1)°C, terkalibrasi;
- b) Penangas air tertutup dengan sistem sirkulasi, ($45,5 \pm 0,2$) °C;
- c) Rak untuk tabung reaksi;
- d) Pipet ukur 10 mL dan 1 mL steril terkalibrasi, berskala 0,1 mL;
- e) Botol pengencer terbuat dari gelas borosilikat, dengan tutup ulir plastik;
- f) Tabung reaksi dan tabung *Durham*;
- g) Cawan petri gelas/plastik steril (berukuran minimal 15 mm x 100 mm); dan
- h) Jarum Ose, dengan diameter dalam kira-kira 3 mm.

A.6.3.3 Pembenihan pengencer dan pereaksi

- a) *Lauryl sulfate tryptose* (LST) broth / *lauryl tryptose* (LT) broth;
- b) *Brilliant green lactose bile* (BGLB) broth 2 %;
- c) *Escherichia coli* (EC) broth;
- d) Agar *Levine's eosin methylene blue* (L-EMB);
- e) *Plate count agar* (PCA);
- f) *Gram stain*;
- g) *Tryptone (tryptophane) broth*;
- h) Pereaksi Kovacs';
- i) *Methyl red – Voges Proskauer* (MR – VP) broth;
- j) Pereaksi *Voges Proskauer*;
- k) Larutan merah metil;
- l) *Koser's citrate broth*;
- m) *Peptone diluents* 0,1 %;
- n) Pereaksi indol;
- o) Larutan kalium hidroksida, KOH 40 %;
- p) *Butterfields phosphate buffered dilution water* (BPB);
- q) Larutan alfa naftol 5 %; dan
- r) Kristal kreatin.

A.6.3.4 Cara kerja**A.6.3.4.1 APM - Uji pendugaan untuk bakteri *Coliform***

- Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh sesuai dengan A.6.1;
- inokulasikan masing-masing 1 mL larutan dari setiap tingkat pengenceran (larutan 10^{-1} , 10^{-2} dan 10^{-3}) ke dalam tiga tabung *lauryl sulfate tryptose* (LST) *broth* yang di dalamnya terdapat tabung *Durham* terbalik. Pegang pipet sedemikian sehingga ujung bawah pipet menempel pada tabung. Biarkan isi pipet mengalir 2 detik sampai dengan 3 detik. Pipet jangan ditiup untuk mengeluarkan isinya;
- masukkan tabung-tabung tersebut ke dalam inkubator pada suhu 35°C selama (48 ± 2) jam;
- amati tabung-tabung tersebut pada pada jam ke- (24 ± 2) . Jika ada tabung yang telah mengandung gas, maka tabung tersebut dinyatakan "positif";
- tabung-tabung yang belum mengandung gas dinyatakan "negatif", lanjutkan inkubasi selama 24 jam;
- catat adanya pembentukan gas dalam jumlah berapapun setelah inkubasi (48 ± 2) jam, dan nyatakan tabung tersebut "positif"; dan
- lakukan uji penegasan terhadap semua tabung yang positif dalam uji pendugaan.

A.6.3.4.2 APM - Uji penegasan untuk bakteri *Coliform*

- Kocok tabung LST *broth* yang positif secara hati-hati dengan cara memutar-mutar tabung;
- pindahkan satu mata Ose dari setiap tabung LST *broth* yang positif ke dalam tabung BGLB *broth* 2 % yang berlainan;
- masukkan tabung-tabung BGLB *broth* 2 % ke dalam inkubator pada suhu 35°C selama (48 ± 2) jam;
- Tentukan APM sesuai dengan Tabel A.1 berdasarkan jumlah tabung BGLB *broth* yang memperlihatkan pembentukan gas dalam jumlah berapapun, selama (48 ± 2) jam pada 35°C ; dan
- laporkan bakteri *Coliform* sebagai APM per 100 mililiter.

Tabel A.1 - APM/100 mL contoh bila menggunakan 3 x 5 tabung untuk setiap pengenceran 10 mL/100 mL; 1,0 mL/100 mL; dan 0,1 mL/ 100 mL.

Tabung yang positif			APM	Tabung yang positif			APM
10	1,0	0,1		10	1,0	0,1	
0	0	0	< 1,8	4	0	3	25
0	0	1	1,8	4	1	0	17
0	1	0	1,8	4	1	1	21
0	1	1	3,6	4	1	2	26
0	2	0	3,7	4	1	3	31
0	2	1	5,5	4	2	0	22
0	3	0	5,6	4	2	1	26
1	0	0	2,0	4	2	2	32
1	0	1	4,0	4	2	3	38
1	0	2	6,0	4	3	0	27
1	1	0	4,0	4	3	1	33
1	1	1	6,1	4	3	2	39
1	1	2	8,1	4	4	0	34
1	2	0	6,1	4	4	1	40
1	2	1	8,2	4	4	2	47
1	3	0	8,3	4	5	0	41
1	3	1	10	4	5	1	48
1	4	0	10	5	0	0	23
2	0	0	4,5	5	0	1	31
2	0	1	6,8	5	0	2	43
2	0	2	9,1	5	0	3	58
2	1	0	6,8	5	1	0	33
2	1	1	9,2	5	1	1	46
2	1	2	12	5	1	2	63
2	2	0	9,3	5	1	3	84
2	2	1	12	5	2	0	49
2	2	2	14	5	2	1	70
2	3	0	12	5	2	2	94
2	3	1	14	5	2	3	120
2	4	0	15	5	2	4	150
3	0	0	7,8	5	3	0	79
3	0	1	11	5	3	1	110
3	0	2	13	5	3	2	140
3	1	0	11	5	3	3	170

Tabel A.1 - APM/100 mL contoh bila menggunakan 3 x 5 tabung untuk setiap pengenceran 10 mL/100 mL; 1,0 mL/100 mL; dan 0,1 mL/ 100 mL (Lanjutan)

3	1	1	14	5	3	4	210
3	1	2	17	5	4	0	130
3	2	0	14	5	4	1	170
3	2	1	17	5	4	2	220
3	2	2	20	5	4	3	280
3	3	0	17	5	4	4	350
3	3	1	21	5	4	5	430
3	3	2	24	5	5	0	240
3	4	0	21	5	5	1	350
3	4	1	24	5	5	2	540
3	5	0	25	5	5	3	920
4	0	0	13	5	5	4	1600
4	0	1	17	5	5	5	>1600
4	0	2	21				

A.6.3.4.3 APM – Uji penegasan untuk *Escherichia coli*

- Pindahkan satu mata Ose dari setiap tabung LST *broth* yang positif ke dalam tabung EC *broth* yang berlainan;
- inkubasikan tabung EC *broth* tersebut ke dalam penangas air yang bersirkulasi, selama (24 ± 2) jam pada suhu $(45,5 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$, tabung yang telah terbentuk gas dinyatakan positif;
- apabila negatif, inkubasikan dan periksa kembali pada jam ke- (48 ± 2) . Jika telah terbentuk gas maka tabung tersebut dinyatakan positif; dan
- Lakukan uji lengkap terhadap semua tabung yang positif untuk uji penegasan.

A.6.3.4.4 APM – Uji lengkap untuk *Escherichia coli*

- Kocok tabung-tabung EC *broth* yang positif secara hati-hati;
- ambil koloni sebesar satu mata Ose kemudian digoreskan/ditanamkan pada satu cawan agar L-EMB, sedemikian rupa hingga dihasilkan koloni yang terpisah-pisah dengan jarak minimal 0,5 cm;
- inkubasikan cawan agar L-EMB tersebut selama 18 jam sampai dengan 24 jam pada suhu $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- periksa cawan-cawan terhadap adanya koloni yang berwarna gelap dengan atau tanpa kilat logam;
- dari tiap cawan agar L-EMB, pindahkan maksimal 5 koloni yang diDuga *E.coli* pada tabung agar miring PCA;
- inkubasikan tabung-tabung agar miring tersebut selama 18 jam sampai dengan 24 jam pada suhu $35 ^\circ\text{C}$ dan gunakan untuk uji selanjutnya;
- buatlah pewarnaan Gram dari tiap biakan. *E coli* adalah Gram negatif dan berbentuk batang tak berspora yang harus diuji menggunakan reaksi-reaksi IMVIC seperti di bawah ini, serta harus diinokulasikan kembali ke tabung LST *broth* untuk menegaskan adanya produksi gas:
 - uji indol ;
 - Inokulasi tabung *tryptone (tryptophane) broth* dari setiap tabung PCA;
 - inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu $35 ^\circ\text{C}$;
 - uji terbentuknya indol dilakukan dengan menambahkan 0,2 mL sampai dengan 0,3 mL pereaksi Kovacs'; dan
 - uji adalah positif bila terbentuk warna merah pada lapisan atas.

- uji *Voges Proskauer* ;
 - Inokulasi tabung media MR-VP *broth* dari setiap tabung PCA dan inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C ;
 - pindahkan 1 mL biakan secara aseptik ke dalam tabung reaksi steril;
 - tambahkan 0,6 mL larutan alfa naftol 5 % dalam alkohol, dan 0,2 mL larutan KOH 40 %, serta beberapa butir kristal kreatin, dan kocok;
 - uji *Voges Proskauer* adalah positif bila terbentuk warna eosin merah muda dalam waktu 2 jam.
- uji merah metil;
 - Setelah uji *Voges Proskauer*, inkubasikan kembali tabung MR-VP *broth* selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C ;
 - tambahkan 5 tetes indikator merah metil pada setiap tabung; dan
 - uji merah metil adalah positif bila terbentuk warna merah, dan negatif bila terbentuk warna kuning.
- penggunaan sitrat;
 - Inokulasi tabung *Koser's citrate broth* dengan hati-hati menggunakan jarum lurus sedemikian rupa sehingga hanya mengenai permukaan media. Terlalu banyak inokulasi dapat menyebabkan terbawanya zat-zat lain;
 - inkubasikan selama 96 jam pada suhu 35°C ; dan
 - uji sitrat adalah positif bila terbentuk kekeruhan yang menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri dalam tabung.
- Uji pembentukan gas dari laktosa.
 - Inokulasikan tabung LST *broth* dari setiap agar miring PCA. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , dan
 - periksa tabung-tabung itu terhadap adanya pembentukan gas.

A.6.3.4.5 Klasifikasi dan laporan

Tabel A.2 - Reaksi biokimia *Escherichia coli* pada uji IMVIC

<i>Escherichia coli</i>	Indol	Merah metil	<i>Voges Proskauer</i>	Sitrat
Varitas I	+	+	-	-
Varitas II	-	+	-	-

- a) Nyatakan positif/100 mL sebagai bakteri *E.coli* jika hasil uji lengkap memenuhi kriteria:
 - uji IMVIC mengikuti pola + + - - atau - + - -, sesuai Tabel A.2;
 - pewarnaan Gram menunjukkan Gram negatif bentuk batang tidak berspora, dan
 - terbentuknya gas dalam LST *broth* dengan waktu inkubasi (48 ± 2) jam pada suhu 35°C
- b) Apabila tidak memenuhi kriteria di atas, maka nyatakan hasil bakteri *E.coli* sebagai negatif/100 mL.

A.6.4 *Salmonella* sp.

A.6.4.1 Prinsip

Contoh yang diuji ditumbuhkan terlebih dahulu pada media pengkayaan dan kemudian ditumbuhkan pada media selektif. Selanjutnya contoh dideteksi dengan menumbuhkannya pada media agar selektif. Koloni-koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media selektif kemudian diisolasi dan dilanjutkan dengan konfirmasi melalui uji biokimia dan uji serologi untuk meyakinkan ada atau tidaknya bakteri *Salmonella* sp.

A.6.4.2 Peralatan

- a) Inkubator terkalibrasi, $(35 \pm 2) ^\circ\text{C}$;
- b) Inkubator *refrigerated* atau *laboratory refrigerator* $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$;
- c) Otoklaf terkalibrasi;
- d) Oven terkalibrasi;
- e) Neraca, kapasitas 2 000 g terkalibrasi, dengan ketelitian 0,1 g;
- f) Neraca, kapasitas 120 g terkalibrasi, dengan ketelitian 5 mg;
- g) Penangas air, $(49 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- h) Penangas air, bersirkulasi, *thermostatically-controlled*, $(42 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$;
- i) pH meter;
- j) Blender dan blender jar (botol) steril;
- k) Botol bertutup ulir bermulut lebar (500 mL) steril, labu Erlenmeyer 500 mL steril, *beaker*, 250 mL steril, *sterile glass* atau *paper funnels* dengan ukuran sesuai, dan, pilihan lain, kontainer dengan kapasitas sesuai untuk mengakomodasi contoh komposit;
- l) *Bent glass* atau batang penyebar plastik steril;
- m) Sendok steril, atau peralatan lain untuk memindahkan contoh makanan;
- n) Cawan petri steril, 15 x 100 mm, kaca atau plastik;
- o) Pipet steril, 1mL dengan ketelitian 0,01 mL; dan pipet steril 5 dan 10 mL dengan skala 0,1 mL terkalibrasi;
- p) Jarum Ose (diameter ± 3 mm), terbuat dari *nichrome*, *platinum-iridium chromel wire* atau plastik steril;
- q) Jarum Ose yang berujung runcing;
- r) Tabung reaksi atau tabung biakan steril, 16 x 150 mm dan 20 x 150 mm; tabung serologikal, 10 x 75 mm atau 13 x 100 mm;
- s) Botol pengencer 500 mL;
- t) Rak tabung reaksi atau rak tabung biakan;
- u) Vorteks mixer;
- v) Lampu (untuk mengamati reaksi serologi);
- w) *Fisher* atau *Bunsen burner*;
- x) Kertas pH (kisaran pH 6 - 8) dengan ketelitian maksimal 0,4 unit pH per perubahan warna; dan
- y) Gunting, gunting besar, pisau bedah, dan *forceps* steril;

A.6.4.3 Perbenihan dan pereaksi

- a) *Universal preenrichment broth*;
- b) *Tetrathionate (TT) broth*;
- c) Media *Rappaport-Vassiliadis* (RV) (media RV harus dibuat dari bahan-bahan yang terdapat dalam komposisi media RV tersebut. Formulasi yang tersedia secara komersial tidak dapat diterima);
- d) Agar *Xylose lysine desoxycholate* (XLD);
- e) Agar *Hektoen enteric* (HE);
- f) Agar *Bismuth sulfite* (BS);
- g) Agar *Triple sugar iron* (TSI);
- h) *Tryptone* (atau *tryptophane*) *broth* (TB);
- i) *Trypticase soy-tryptose broth* (TSTB);
- j) Methyl red-Voges Proskeaur (MR-VP) *broth*
- k) Agar *Simmons citrate*;
- l) *Urea broth*;
- m) *Rapid urea broth*;
- n) *Malonate broth*;
- o) *Lysine iron agar* (LIA) (Edward dan Fife)
- p) *Lysine decarboxylase broth* (LDB);

- q) *Potassium cyanide (KCN) broth*;
- r) *Phenol red carbohydrate broth* (*Phenol red lactose broth* dan *Phenol red red sucrose broth*) atau *Purple carbohydrate broth* (*Purple lactose broth* dan *Purple sucrose broth*);
- s) *Phenol red dulcitol* atau *Purple broth base* dengan 0,5 % *dulcitol*;
- t) *Agar MacConkey*;
- u) *Brain heart infusion (BHI) broth*;
- v) *Tryptose blood agar base*;
- w) *Pereaksi Kovacs'*;
- x) *Pereaksi uji Voges-Proskauer (VP)*;
- y) *Kristal kreatin fosfat*;
- z) *Larutan potasium hidroksida (KOH)*, 40 %;
- aa) *Larutan bromocresol purple dye*, 0,2 %;
- bb) *Indikator merah metil*;
- cc) *Indikator phenol red* atau *bromocresol purple*;
- dd) *Air suling steril*;
- ee) *Larutan physiological saline*, 0,85 % (steril);
- ff) *Larutan formanilized physiological saline*;
- gg) *Formanilized antigen*;
- hh) *Alfa naftol*;
- ii) *Salmonella polyvalent somatic (O) antiserum*;
- gg) *Salmonella polyvalent flagellar (H) antiserum*;
- kk) *Salmonella polyvalent somatic (O) antiserum*; dan
- ll) *Salmonella somatic group (O) antisera*: A, B, C₁, C₂, C₃, D₁, D₂, E₁, E₂, E₃, E₄, F, G, H, I, Vi, atau kelompok lain yang sesuai.

A.6.4.4 Cara Kerja

A.6.4.4.1 Homogenisasi contoh dan pra-pengkayaan

- a) Pipet 100 mL contoh ke dalam blender yang steril dan tambahkan 900 mL *universal preenrichment broth* steril. Kocok selama 2 menit;
- b) pindahkan secara aseptik ke dalam botol pengencer 1 000 mL dan biarkan pada suhu ruang selama (60 ± 5) menit dengan wadah tertutup, kemudian kocok perlahan;
- c) tambahkan 0,45 mL larutan *Briliant green dye* 1 %, kocok hingga tercampur merata; dan
- d) kendurkan tutup wadah secukupnya 1/4 putaran. Inkubasikan selama (24 ± 2) jam pada 35 °C.

A.6.4.4.2 Pengkayaan

- a) Kencangkan tutup wadah dan kocok secara perlahan contoh yang telah selesai diinkubasi;
- b) pipet 0,1 mL biakan pra-pengkayaan kedalam 10 mL media *Rappaport-Vassiliadis (RV)* dan 1 mL biakan pra-pengkayaan lainnya ke dalam 10 mL *tetrathionate (TT) broth* dan vortex masing-masing campuran tersebut; dan
- c) inkubasikan media RV pada suhu (42 ± 0,2) °C selama (24 ± 2) jam dalam penangas air bersirkulasi dan TT *broth* pada (35 ± 2,0) °C selama (24 ± 2) jam.

A.6.4.4.3 Penanaman pada pembenihan pilihan/selektif

- a) Kocok contoh yang telah diinkubasi dan dengan menggunakan jarum Ose 3 mm, goreskan biakan pengkayaan TT *broth* ke dalam cawan petri yang berisi media agar XLD, HE dan BS. Siapkan agar BS sehari sebelum digunakan dan simpan di tempat gelap pada suhu ruang sampai siap digores.
- b) ulangi cara di atas dari media agar pengkayaan RV;

- c) inkubasikan cawan-cawan media agar BS, HE dan XLD selama (24 ± 2) jam pada suhu 35°C ;
- d) amati kemungkinan adanya koloni *Salmonella* sp., setelah inkubasi (24 ± 2) jam; Ambil 2 atau lebih koloni *Salmonella* sp. dari masing-masing media agar selektif setelah (24 ± 2) jam inkubasi. Morfologi koloni mempunyai ciri-ciri sebagai berikut:
- XLD : koloni berwarna merah jambu (pink) dengan atau tanpa inti hitam. Kebanyakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilap atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam.
 - HE : koloni berwarna hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Kebanyakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam.
 - BS : koloni berwarna coklat, abu-abu sampai hitam dan kadang-kadang kilap logam. Jika masa inkubasi bertambah maka warna media disekitar koloni mula-mula coklat kemudian menjadi hitam. Pada beberapa strain koloni berwarna hijau dengan atau tanpa warna gelap disekitar media.
- e) jika tidak ada koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media agar BS setelah inkubasi (24 ± 2) jam, jangan mengambil koloni tapi inkubasi kembali media selama (24 ± 2) jam. Jika tidak ada koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media agar BS setelah inkubasi (48 ± 2) jam, ambil 2 atau lebih koloni tersebut;
- f) dengan menggunakan jarum Ose berujung runcing steril, ambil secara hati-hati bagian tengah koloni dan inokulasikan kedalam media agar miring TSI dengan cara menggores agar miring dan menusuk agar tegak. Tanpa mengambil koloni baru, gunakan jarum yang sama untuk menginokulasikan media LIA dengan cara menusuk agar tegak lebih dahulu, setelah itu goreskan pada agar miring. Karena reaksi *Lysine decarboxylase* sangat anaerobik, agar miring LIA harus mempunyai tusukan yang dalam (4 cm). Simpan media agar selektif yang telah diambil koloni pada suhu $(5 - 8)^{\circ}\text{C}$;
- g) inkubasi agar miring TSI dan LIA pada suhu 35°C selama (24 ± 2) jam dengan membiarkan tutup sedikit kendur untuk mencegah terbentuknya H_2S yang berlebihan. Pada TSI, biakan *Salmonella* sp. akan menghasilkan alkalin (merah) pada media agar miring dan asam (kuning) pada tusukan agar tegak, dengan atau tanpa memproduksi H_2S (warna kehitaman pada agar). Pada LIA biakan *Salmonella* sp. akan menghasilkan reaksi alkalin (ungu) pada tusukan pada agar tegak. Reaksi yang benar-benar kuning pada tusukan dinyatakan sebagai negatif. Jangan hanya melihat perubahan warna pada tusukan untuk menyatakan negatif. Umumnya biakan *Salmonella* sp. membentuk H_2S pada LIA. Beberapa biakan non *Salmonella* sp. membentuk reaksi merah bata pada agar miring LIA;
- h) semua biakan yang memberikan reaksi alkalin pada bagian tusukan didalam media LIA tanpa memperhatikan reaksi TSI akan dianggap sebagai *Salmonella* sp. dan dilakukan uji biokimia dan serologi. Biakan yang menghasilkan asam pada tusukan pada media agar tegak LIA dan alkalin pada agar miring serta reaksi asam pada tusukan pada media agar tegak TSI harus dipertimbangkan juga sebagai *Salmonella* sp. dan harus dilakukan uji biokimia dan serologi. Biakan yang memberikan reaksi asam pada tusukan di media agar tegak LIA dan asam pada agar miring TSI, dan reaksi asam pada tusukannya di media agar tegak TSI dapat dinyatakan sebagai bukan *Salmonella* sp.. Bila biakan TSI tidak menunjukkan reaksi khas *Salmonella* sp. (alkalin pada goresan dan asam pada tusukan), ulangi lagi pengujian dengan mengambil koloni yang diduga dari media selektif yang tidak memberikan biakan duga positif dan inokulasi dengan menggores media TSI dan LIA seperti cara mulai pasal f di atas; dan
- i) lakukan uji identifikasi biokimia dan serologi terhadap:
- tiga biakan presumtif TSI dari 1 set media agar selektif (HE, XLD dan BS) yang diinokulasi dari TTB, dan tiga biakan presumtif yang diinokulasikan dari RV;
 - jika tiga biakan presumtif positif TSI tidak terisolasi dari 1 set media agar selektif, uji presumtif positif TSI dari media agar yang lain. Uji sedikitnya 6 biakan TSI untuk setiap 100 mL contoh minuman.

A.6.4.5 Identifikasi *Salmonella* sp.

A.6.4.5.1 Biakan campuran

- a) Apabila biakan agar TSI terlihat tercampur, maka goreskan kembali kedalam media agar *MacConkey*, HE atau *XLD broth*. Inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu 35°C . Amati koloni yang diduga *Salmonella* sp., yaitu :
 - agar *Mac Conkey* . Koloni tampak transparan dan tidak berwarna, kadang-kadang dengan inti hitam. Koloni-koloni *Salmonella* sp. akan membentuk area yang terang dari pengendapan *bile* disebabkan oleh bakteri lain yang muncul atau tumbuh;
 - agar *hektoen enteric* (HE). Koloni-koloni hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya biakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam;
 - agar *xylose lysine desoxycholate* (XLD). Koloni merah muda dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya biakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam.
- b) pindahkan sedikitnya 2 koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media TSI dan LIA sesuai dengan A.6.4.4.3.f dan lanjutkan sesuai dengan A.6.4.4.3.g.

A.6.4.5.2 Biakan murni

- a) Uji urease (konvensional); dan
Inokulasikan koloni yang diduga *Salmonella* sp. dari media agar miring TSI dengan jarum Ose runcing ke dalam tabung *urea broth*. Karena kadang-kadang tabung *urea broth* yang tidak diinokulasikan biakan akan berubah warna menjadi merah keunguan (uji positif) maka perlu dibuat tabung *urea broth* tanpa inokulasi sebagai kontrol. Inkubasikan selama (24 ± 2) jam pada suhu 35°C ; dan
- b) uji urease (cepat).
Inokulasikan dari TSI yang diduga *Salmonella* sp. dari media agar miring TSI dengan jarum Ose berdiameter 3 mm ke dalam *rapid urea Broth*. Inokulasikan 2 jam dalam penangas air pada suhu $(37 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$. Reaksi *Salmonella* sp. akan memberikan hasil negatif (tidak terjadi perubahan warna), walaupun demikian perlu uji lebih lanjut .

A.6.4.5.3 Pengujian biakan urease negatif

- a) *Lysine decarboxylase* (LD) *broth*;
Uji ini dilakukan hanya jika reaksi LIA meragukan. Ambil 1 Ose koloni yang diduga *Salmonella* sp. dari agar miring TSI dan inokulasikan ke dalam media LDB. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , tetapi amati setelah 24 jam. *Salmonella* sp. memberikan reaksi alkalin ditandai dengan warna ungu pada seluruh media. Reaksi negatif ditunjukkan dengan warna kuning pada seluruh media. Jika hasil reaksi tidak menunjukkan warna kuning atau ungu tambahkan beberapa tetes 0,2 % *bromocresol purple dye* dan amati perubahan warnanya.
- b) *Phenol red dulcitol* atau *purple broth base* dengan 0,5 % *dulcitol*; dan
inokulasi media *dulcitol broth* dari biakan TSI. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , tetapi amati setelah inkubasi 24 jam. Pada umumnya *Salmonella* sp. memberikan hasil positif yang ditandai dengan pembentukan gas dalam tabung *Durham* dan pH asam (kuning) pada media. Reaksi negatif ditandai dengan tidak terbentuknya gas pada tabung *Durham* dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media.
- c) *Tryptone (tryptophane) broth* (TB);
Inokulasi media *tryptone broth* dari biakan TSI. Inkubasikan selama 24 jam pada suhu 35°C dan selanjutnya ikuti prosedur di bawah ini:
 - *Potassium cyanide* (KCN) *broth*

Pindahkan 1 mata Ose biakan dari TB 24 jam kedalam media KCN *broth*. Tutup tabung rapat-rapat dan bila perlu dilapisi dengan parafin atau film. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C tetapi amati setelah 24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan (ditandai dengan adanya kekeruhan). Umumnya *Salmonella* sp. tidak tumbuh pada media ini dengan ditandai dengan tidak terjadinya kekeruhan.

- *malonate broth*

Pindahkan 1 mata Ose dari biakan TB kedalam media *Malonate broth*. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , tetapi amati setelah 24 jam. Kadang-kadang tabung *malonate broth* yang tidak diinokulasi berubah menjadi biru. Oleh karena itu gunakan *malonate broth* sebagai kontrol. Reaksi positif ditandai dengan perubahan warna menjadi biru. Umumnya *Salmonella* sp. memberikan reaksi negatif (hijau atau tidak ada perubahan warna) pada *broth* ini.

- uji indol

Dari media TB yang tersisa pindahkan 5 mL biakan ke dalam tabung reaksi steril, tambahkan 0,2 mL sampai dengan 0,3 mL pereaksi Kovacs'. Amati segera setelah penambahan pereaksi. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya cincin merah pada permukaan media. Umumnya *Salmonella* sp. Memberikan reaksi negatif (tidak terbentuk cincin merah pada permukaan media). Reaksi yang warnanya berada antara jingga dan merah muda dinyatakan sebagai positif.

Nyatakan biakan sebagai bukan *Salmonella* sp. bila reaksi indol positif dan *flagellar* (H) negatif, atau KCN positif dan LDB negatif;

A.6.4.5.4 Uji serologi polyvalent flagellar (H)

- a) Inokulasi dari masing-masing agar TSI yang memberikan reaksi urease negatif kedalam:
 - BHI *broth*, dan inkubasi selama 4 jam sampai dengan 6 jam pada suhu 35°C sampai terlihat pertumbuhan (untuk diuji pada hari yang sama); atau
 - *trypticase soy tryptose* (TST) *broth* dan inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu 35°C (untuk diuji hari berikutnya). Tambahkan 2,5 mL larutan *formanilized physiological saline* ke dalam 5 mL biakan di atas.
- b) siapkan 2 biakan dari TSI (contoh dan kontrol) yang telah diberi *formanilized physiological saline* dan uji dengan *Salmonella polyvalent flagellar* (H) antisera. Masukkan $\pm 0,5$ mL larutan *saline Salmonella polyvalent flagellar* (H) antisera dalam tabung serologi 10 mm x 75 mm atau 13 mm x 100 mm. Tambahkan 0,5 mL antigen yang akan diuji. Siapkan kontrol *saline* dengan mencampur 0,5 mL *formanilized physiological saline* dengan 0,5 mL *formanilized* antigen. Inkubasikan campuran tersebut dalam penangas air pada suhu 48°C sampai dengan 50°C . Amati setiap interval waktu 15 menit dan amati hasilnya dalam 1 jam.
 - Positif apabila terjadi penggumpalan dalam uji campuran dan tidak ada penggumpalan dalam kontrol;
 - negatif apabila tidak ada penggumpalan dalam uji campuran dan dalam kontrol; dan
 - non spesifik terjadi penggumpalan dalam uji campuran dan kontrol.

A.6.4.5.5 Uji serologi polyvalent somatic (o)

- a) Dengan menggunakan pensil, buat garis empat persegi-panjang berukuran 1 cm x 2 cm di atas kaca atau cawan petri plastik berukuran 15 mm x 100 mm atau di atas gelas sediaan;
- b) emulsikan biakan dari media agar miring TSI umur 24 jam sampai dengan 48 jam dengan 2 mL 0,85 % *saline* menggunakan jarum Ose (dapat juga menggunakan biakan dari *tryptose blood agar base* tanpa darah);
- c) tambahkan 1 tetes suspensi biakan di atas masing-masing bagian empat-persegi panjang yang telah diberi tanda dengan pensil;

- d) tambahkan 1 tetes larutan *saline* pada bagian pertama dan tambahkan 1 tetes *polyvalent somatic (o) antiserum* ke dalam bagian yang lain;
- e) campurkan atau homogenkan bagian atas menggunakan jarum Ose yang bersih dan steril selama 1 menit; dan
- f) klasifikasi uji *polyvalent somatic (o)* menunjukkan hasil sebagai berikut:
 - Positif : terjadi penggumpalan di dalam pencampuran uji, pada kontrol *saline* tidak terjadi penggumpalan;
 - negatif : tidak terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, dan kontrol *saline*;
 - non spesifik : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji dan pada kontrol *saline*.

A.6.4.5.6 Uji biokimia tambahan

Nyatakan sebagai *Salmonella* sp., biakan yang memberikan reaksi yang khas sesuai dengan Tabel A.3 butir 1-11. Jika 1 biakan media agar TSI dari setiap 100 mL contoh menunjukkan *Salmonella* sp., uji biokimia tambahan tidak diperlukan. Biakan yang memberikan reaksi positif pada uji serologi *flagellar (H)* tapi tidak menunjukkan karakteristik *Salmonella* sp. pada uji biokimia, harus dimurnikan sesuai dengan A.6.4.5.1 diatas dan uji kembali, sesuai dengan A.6.4.5.2

Lakukan uji tambahan berikut ini terhadap biakan yang tidak memberikan reaksi yang khas seperti Tabel A.3 :

- a) *Phenol red lactose* atau *purple lactose broth*;
 - Inokulasi broth ini dengan biakan agar miring TSI yang telah diinkubasi selama 24 jam sampai 48 jam. Inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , tetapi amati setelah 24 jam;
 - nyatakan positif, apabila terjadi pembentukan asam (kuning) dan gas pada tabung *Durham*. Apabila hanya terjadi pembentukan asam, maka dapat dinyatakan positif. Umumnya *Salmonella* sp. memberikan hasil negatif, ditunjukkan dengan tidak terbentuknya gas pada tabung *Durham* dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media;
 - jika biakan memberikan reaksi *lactose* positif, maka nyatakan sebagai bukan *Salmonella* sp., kecuali biakan yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi positif pada LIA atau reaksi positif pada *malonate broth*.
 - b) *Phenol red sucrose* atau *purple sucrose broth*;
Ikuti prosedur seperti pada A.6.4.5.6.a. Nyatakan sebagai bukan *Salmonella* sp. pada biakan yang memberikan reaksi positif uji sukrosa, kecuali biakan yang memberikan reaksi asam pada media agar miring TSI dan reaksi positif (alkalin) pada LIA;
 - c) *Methyl red-Voges-Proskauer (MR-VP) broth*;
Inokulasi media dengan sedikit biakan media agar miring TSI dan inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C ;
Lakukan uji *Voges-Proskauer (VP)* pada suhu ruang sebagai berikut :
 - Pindahkan 1 mL *MR-VP broth* yang telah diinkubasi selama (48 ± 2) jam ke dalam tabung reaksi steril dan inkubasikan kembali *MR-VP broth* selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C ;
 - Tambahkan 0,6 mL alfa naftol dan aduk;
 - Tambahkan 0,2 mL larutan KOH 40 % dan aduk kembali. Untuk mempercepat reaksi tambahkan sedikit kristal kreatin dan amati hasilnya setelah 4 jam; dan
 - Perubahan warna menjadi merah bata sampai merah delima pada media menunjukkan reaksi positif. Umumnya *Salmonella* sp. memberikan reaksi VP negatif.
- Uji merah metil (MR)
- Tambahkan 5 tetes sampai dengan 6 tetes indikator merah metil ke dalam 5 mL media *MR-VP* yang telah diinkubasi selama 96 jam;
 - amati hasilnya dengan segera; dan
 - umumnya *Salmonella* sp. memberikan reaksi positif, ditandai dengan terjadinya difusi warna merah pada media. Terjadinya warna kuning menunjukkan reaksi negatif.

Nyatakan sebagai bukan *Salmonella* sp. biakan yang memberikan reaksi KCN dan VP positif serta MR negatif.

d) Agar *Simmons citrate*.

- Inokulasi media dengan menggunakan jarum yang mengandung biakan dari TSI agar miring, dengan cara menggores agar miring dan menusuk bagian tegak. Inkubasikan selama (96 ± 2) jam pada suhu 35°C ;
- nyatakan positif apabila terjadi pertumbuhan yang biasanya diikuti dengan perubahan warna dari hijau menjadi biru. Umumnya *Salmonella* sp. memberikan hasil sitrat positif;
- negatif apabila tidak ada atau sedikit sekali pertumbuhan dan tidak terjadi perubahan warna.

A.6.4.5.7 Pernyataan hasil

Laporkan sebagai *Salmonella* sp. biakan-biakan yang mempunyai reaksi seperti pada Tabel A.3. Laporkan sebagai bukan *Salmonella* sp. biakan-biakan yang memberikan reaksi seperti pada Tabel A.4. Bila tidak ada 1 biakan media agar TSI yang menunjukkan reaksi *Salmonella* sp. pada uji biokimia, lakukan uji biokimia sesuai dengan A.6.4.5.3 terhadap biakan yang memberikan reaksi urease negatif dari contoh yang sama.

Tabel A.3 - Reaksi biokimia dan serologi untuk *Salmonella* sp.

No.	Substrat uji	Hasil reaksi		<i>Salmonella</i> sp. reaksi species ^a
		Positif	Negatif	
1.	Glukosa (TSI)	tusukan kuning	tusukan merah	+
2.	<i>Lysine decarboxylase</i> (LIA)	tusukan ungu	tusukan kuning	+
3.	H ₂ S (TSI dan LIA)	Hitam	tidak hitam	+
4.	Urease	warna ungu sampai merah	tidak ada perubahan warna	-
5.	<i>Lysine decarboxy broth</i>	warna ungu	warna kuning	+
6.	<i>Phenol red dulcitol broth</i>	warna kuning dan/atau gas	tanpa/ tidak berbentuk gas, tidak berubah warna	+ ^b
7.	KCN broth	pertumbuhan	tidak ada pertumbuhan	-
8.	<i>Malonate broth</i>	warna biru	tidak berubah warna	- ^c
9.	Uji indol	permukaan bewarna nila	permukaan bewarna kuning	-
10.	Uji <i>Polyvalent flagellar</i>	penggumpalan	tidak penggumpalan	+
11.	Uji <i>Polyvalent somatic</i>	penggumpalan	tidak penggumpalan	+
12.	<i>Phenol red lactose broth</i>	warna kuning dan/atau gas	tidak berbentuk gas dan tidak berubah warna	- ^c
13.	<i>Phenol red sucrose broth</i>	warna kuning dan/atau gas	tidak berbentuk gas dan tidak berubah warna	-
14.	Uji <i>Voges-Proskauer</i>	merah muda sampai merah	tidak berubah warna	-
15.	Uji merah metil	merah menyebar	kuning menyebar	+
16.	<i>Simmons citrate</i>	pertumbuhan, warna biru	tidak ada pertumbuhan dan perubahan warna	V

Keterangan:

^a+ adalah 90 % atau lebih positif dalam satu atau dua hari;

- adalah 90 % atau lebih negatif dalam satu atau dua hari;

V adalah variabel;

^b adalah mayoritas dari biakan *Salmonella arizonae*: negatif;

^c adalah mayoritas dari biakan *Salmonella arizonae*: positif.

Tabel A.4 - Reaksi biokimia dan serologi untuk non *Salmonella* sp.

No	Substrat uji	Hasil
1	<i>Urease</i>	positif (warna ungu-merah)
2	Uji indol dan <i>polivalent flagellar</i> (H) atau uji indol dan uji Spicer-Edwards <i>flagellar</i>	positif (permukaan warna nila) negatif (tidak ada penggumpalan) positif (permukaan warna nila) negatif (tidak ada penggumpalan)
3	<i>Lysine decarboxylase</i> dan KCN broth	positif (ada pertumbuhan) negatif (warna kuning)
4	<i>Phenol red lactose broth</i>	positif (warna kuning dan/atau gas) ^{a,b}
5	<i>Phenol red sucrose broth</i>	positif (warna kuning dan/atau gas) ^b
6	KCN broth, uji <i>Voges-Proskauer</i> , dan merah metil	positif (ada pertumbuhan) positif (warna merah muda sampai merah) negatif (warna kuning menyebar)
Keterangan: ^a adalah uji <i>malonate broth</i> lebih lanjut pada biakan yang positif untuk menentukan <i>Salmonella arizonae</i> ^b adalah jangan dibuang biakan positif jika biakan LIA menunjukkan reaksi bercirikan <i>Salmonella</i> sp., uji lebih lanjut untuk mengamati apakah spesies tersebut <i>Salmonella</i> sp..		



Bibliografi

SNI 7387: 2009, *Batas maksimum cemaran logam berat dalam pangan.*

SNI 7388: 2009, *Batas maksimum cemaran mikroba dalam pangan.*

Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 986.15, Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium, and Zinc in Human and Pet Foods, Multielement Method*, 18th Edition, Chapter 9.1.01.

Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 999.11, Lead, Cadmium, Copper, Iron, and Zinc*. 18th Edition, Chapter 9.1.09.

Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 971.21, Mercury in Foods, Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 18th Edition, Chapter 9.2.22.

Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 985.61, Tin in Canned Food, Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 18th Edition, Chapter 9.2.35.

CODEX Alimentarius Commission Volume 13 General Guideline on Sampling CAC/GL 50-2004

Eaton, D. Andrew, Lenore S. Clesceri, Eugene W. Rice, dan Arnold E. Greenberg. 2005. *Standard Methods for The Examination of Water and Wastewater*. 21st Edition, Chapter 9221.

Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2001. *Aerobic Plate Count*. Chapter 3.

Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2002. *Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria*. Chapter 4.

Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2003. *Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate*. Chapter 1.

Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2007. *Salmonella* sp.. Chapter 5.

The International Organization for Standardization. 2005. *Determination of Substances Characteristic of Green and Black Tea - Part 1: Content of Total Polyphenols in Tea -- Colorimetric Method Using Folin-Ciocalteu Reagent*. ISO 14502-1:2005.









BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3,4,7,10
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : bsn@bsn.go.id